文章编号：0454-6296（2000）增刊-0038-06

阿维菌素对小菜蛾的抗性选育及其对解毒酶活性的影响

李腾武，高希武*，郑炳宗，许向丽
（中国农业大学昆虫学系，北京 100094）

摘要：用阿维菌素对小菜蛾 *Plutella xylostella*（L.）进行了抗性选育，并对选育过程中小菜蛾解毒酶的活性进行了研究。选育从 F_0 至 F_{21} 代，抗性缓慢波动上升，达到选育前的 122.91 倍；F_{21} 至 F_{27} 代，抗性迅速增长，达到选育前的 812.73 倍，抗性发展趋势呈现 S 型曲线。随着选育代数的增加，对乙酰胆碱酯酶（AChE）没有明显的影响；羧酸酯酶（CarE）活性，F_{27} 是 F_0 的 1.5 倍，从 F_{22} 开始，活性在较高水平上波动；谷胱甘肽转移酶（GST）活性 F_{27} 是 F_0 的 2.2 倍，且从 F_{18} 开始，活性在较高水平上波动。选育的抗性品系，增效醚对阿维菌素增效 6.34 倍。

关键词：小菜蛾；阿维菌素；抗性选育；解毒酶；乙酰胆碱酯酶
中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A

小菜蛾 *Plutella xylostella*（L.）之所以成为世界上十字花科蔬菜主要害虫，主要因为其抗药性水平不断提高，这也是在自然选择下不断进化的结果。目前在许多国家或地区小菜蛾已对有机氯、有机磷、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯、酰基脲类和生物制剂（Bt）等产生了不同程度的抗性，抗性水平最高可达数万倍[1,2]。阿维菌素（AVMs）对鳞翅目、同翅目、鞘翅目和双翅目害虫及多种害螨，特别是对常规农药具抗药性的害螨和害虫，如小菜蛾、斑潜蝇、红蜘蛛、菜青虫等均具有良好的防效。

针对小菜蛾抗性水平高、发展速度快、交互抗性谱广，我国开发应用了 AVMs 制剂和以 AVMs 为主的混配制剂来防治小菜蛾，由南方到北方效果良好。目前关于家蝇 *Musca domestica* L.、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*（Say）、二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch、小菜蛾等对 AVMs 抗性的生理生化、遗传学等均有研究报道[3~7]。帅应垣等 1994 年就报道了个别地区小菜蛾对刚刚引进的 AVMs 抗性已达到 7 倍[8]。Wright 等报道马来西亚 Cameron 地区的 4 个小菜蛾田间种群对 AVMs 已产生 17～195 倍抗性，这可能是小菜蛾田间种群对 AVMs 产生明显抗性的首次报道[9]。但就小菜蛾对 AVMs 抗性发展的速度还难以预测，我们在室内对采自河北宣化的田间种群用 AVMs 进行了抗性选育，并对其抗性机制进行了初步的研究。

基金项目：国家“九五”攻关项目
* 通讯作者
收稿日期：1999-08-19；修订日期：2000-02-18

1　材料和方法

1.1　供试昆虫及饲养

宣化种群采自河北省宣化田间，阿维菌素抗性品系（AV-R）由宣化种群室内汰选所得，阿维菌素敏感品系（XH-S）由同源的宣化种群在不接触药剂情况下同步饲养所得，室内饲养采用蛭石萝卜苗法[10,11]。

1.2　化学试剂及药剂

α-乙酸萘酯（α-NA），上海试剂一厂产品，化学纯；β-乙酸萘酯（β-NA），北京化工厂产品，化学纯；碘化硫代乙酰胆碱（ATCh），Fluka 公司产品；5，5'-二硫双硝基苯甲酸(DTNB)，为 Roth 公司产品；还原型谷胱甘肽（GSH），1-氯-2，4-二硝基苯（CDNB），为 Sigma 公司产品；91.2%阿维菌素原药由中国农业大学新技术开发总公司提供；90%增效醚(Pb）为美国 Aldrich 公司产品；Triton X-100 为上海化学试剂采购供应站美国进口分装。

1.3　抗性选育方法

当小菜蛾幼虫群体多数进入 3 龄时（2 mg/头～3 mg/头），根据上一代对 AVMs 的毒力测定结果，配制杀死种群为 70%～80% 的剂量，采用喷雾法将药液均匀喷洒于带有供选试虫的萝卜苗上，需更换的新鲜萝卜苗也喷以相同浓度的药液，继续饲养直到化蛹。逐代进行汰选，隔1～2代进行一次毒力测定。

1.4　生物测定方法

参照 Ismail 和 Wright[12,13]叶片药膜法，取新鲜无农药污染的甘蓝叶片浸在系列浓度的药液中 10 s，以蒸馏水(含 0.01%乳化剂)作对照，室内晾干后接上大小一致的幼虫(2 mg/头～3 mg/头)，每个浓度 3～4 次重复，每个重复 10～20 头幼虫，统计 48 h 结果。增效剂试验以 AVMs 的最高浓度与增效醚的比例 1∶3。用 POLO 软件计算 LC_{50}值和毒力回归方程的斜率(b)。

1.5　羧酸酯酶活性测定

参照高希武等和李腾武等方法[14,15]，将 4 龄幼虫饥饿 12～24 h 后称重，4 mg/头～5 mg/头，加pH7.0，0.04 mol/L 的磷酸缓冲液匀浆，制备的酶液冰浴待测。以 α-NA 或 β-NA 为底物（含毒扁豆碱 10^{-5}mol/L），在 30℃ 水浴反应 15 min，然后加入 1 mL 显色液终止反应，分别在 555 nm 和 600 nm 处测定光密度值，重复 3 次。

1.6　谷胱甘肽转移酶（GST）活性测定

取饥饿 12～24 h 的 4 龄幼虫胸腹部，加 pH6.5，0.1 mol/L 磷酸缓冲液匀浆，制备的酶液冰浴待测。参考 Habig 等方法[16]，取 2.7 mL pH6.5，0.1 mol/L 的磷酸钾缓冲液,0.1 mL GSH,0.1 mL 酶液加入到比色杯中，用 UV-120-02 型分光光度计在 340 nm 下调零，而后加入 0.1 mL CDNB 使反应开始，U-135C 型数据记录仪采集数据，重复 3 次。

1.7　乙酰胆碱酯酶（AChE）活性测定

取饥饿 12～24 h 4 龄幼虫头部，加 pH7.5，0.1 mol/L 磷酸缓冲液匀浆，制备的酶液冰浴待测。采用 Gorun 等改进的 Ellman 等的方法[17,18]。取待测酶液 0.1 mL 与 0.1 mL 底物(ATCh，10 mmol/L）混匀，在 30℃ 水浴反应 15 min，然后加入 3.6 mL DTNB（10^{-5} mol/L）

乙醇（40%）溶液终止反应并显色，在412 nm处测定光密度值，重复3次。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾对阿维菌素的抗性选育

选择对AVMs抗性水平较低的宣化田间种群，分成两组，一组以AVMs进行抗性选育，另一组不接触药剂同步饲养。选育前（F_0代）3龄幼虫的LC_{50}值为0.011 mg/L。开始选育用AVMs处理的浓度为0.016 mg/L，以后处理浓度逐步提高。饲养27代，每代都进行施药。

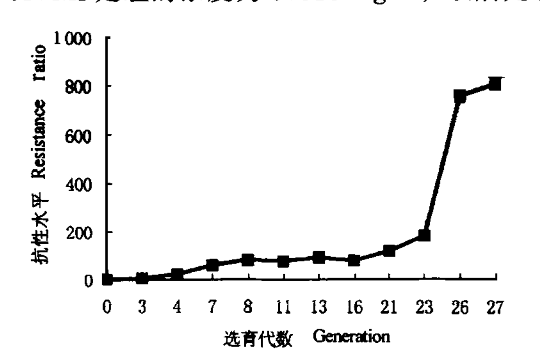


图1 小菜蛾对阿维菌素抗性选育代数与抗性水平的关系

Fig. 1 Selection of diamondback moth resistance by avermectins

从图1可以看出，随着抗性选育代数的增加，LC_{50}值逐渐增大，抗性水平不断提高。在药剂选育初期（F_0～F_3代），抗性发展变化不大，抗性倍数在10以下；从F_3～F_{21}代，抗性逐渐上升，LC_{50}值由0.071上升为1.352，抗性达123倍；从F_{21}～F_{26}代，抗性增长迅速，其抗药性的形成发展呈S型。经过27代选育，该小菜蛾种群对AVMs的敏感度显著下降，即LC_{50}值由选育前的0.011 mg/L上升至选育后的8.940 mg/L，抗性达812.73倍。在选育过程中，抗性并不是直线上升，达到一定程度后，抗性水平在小范围内出现波动。

2.2 阿维菌素选育种群不同世代CarE、GST、AChE的活性变化

由表1、表2、表3可以看出，AVMs对小菜蛾选育27代后同选育前相比，CarE活性F_{27}

表1 AVMs对小菜蛾抗性汰选后不同世代CarE的比活力变化

Table 1 Changes of carboxylesterase activity after selection by avermectins in diamondback moth

世代 Generation	α-NA OD_{600}/(mg·min)	变化倍数 Relative ratio	β-NA OD_{555}/(mg·min)	变化倍数 Relative ratio
F_0	0.978±0.034	1	1.051±0.016	1
F_4	0.863±0.025	0.9	1.134±0.008	1.1
F_6	1.106±0.014	1.1	1.401±0.007	1.3
F_7	0.424±0.005	0.4	0.464±0.004	0.4
F_{10}	0.512±0.011	0.5	0.545±0.006	0.5
F_{11}	0.307±0.003	0.3	0.345±0.001	0.3
F_{13}	0.258±0.004	0.3	0.321±0.004	0.3
F_{16}	0.542±0.008	0.6	0.617±0.006	0.6
F_{18}	0.733±0.036	0.7	0.814±0.021	0.8
F_{19}	0.725±0.009	0.7	0.632±0.015	0.6
F_{20}	0.791±0.020	0.8	0.824±0.008	0.8
F_{22}	1.344±0.025	1.4	1.552±0.046	1.5
F_{23}	0.830±0.014	0.8	1.009±0.029	1.0
F_{24}	1.190±0.082	1.2	1.296±0.003	1.2
F_{25}	0.980±0.027	1.0	1.225±0.010	1.2
F_{26}	1.031±0.032	1.1	1.189±0.023	1.1
F_{27}	1.395±0.054	1.4	1.524±0.024	1.5

代是 F_0 代的 1.4（α-NA）和 1.5（β-NA）倍，差异显著（$P<0.05$），且从 F_{22}代开始，CarE 活性在较高水平上波动。GST 活性变化 F_{27}代是 F_0 代的 2.2 倍，差异极显著（$P<0.01$），且从 F_{18}代开始，GST 活性在较高水平上波动。说明小菜蛾对 AVMs 抗性水平的提高可能部分与 CarE 和 GST 活性增强有关。经过 27 代的选育，AChE 活性总体变化不大，AVMs 的选育对小菜蛾 AChE 没有明显的影响。

表 2　AVMs 对小菜蛾抗性汰选后不同世代 GST 的比活力变化

Table 2　Changes of GST activity after selection by avermectins in diamondback moth

世代 Generation	GST 活性 $OD_{340}/(mg \cdot min)$	变化倍数 Relative ratio
F_0	1.663±0.063	1
F_4	1.320±0.037	0.8
F_6	2.808±0.121	1.7
F_7	1.643±0.029	1.0
F_{10}	1.071±0.036	0.6
F_{11}	1.908±0.030	1.1
F_{13}	1.274±0.043	0.8
F_{16}	1.695±0.041	1.0
F_{18}	3.858±0.117	2.3
F_{19}	3.241±0.039	1.9
F_{20}	3.301±0.103	2.0
F_{22}	3.518±0.145	2.1
F_{23}	2.880±0.135	1.7
F_{24}	2.357±0.044	1.4
F_{25}	2.583±0.110	1.6
F_{26}	2.767±0.063	1.7
F_{27}	3.579±0.114	2.2

表 3　AVMs 对小菜蛾抗性汰选后不同世代 AChE 的比活力变化

Table 3　Changes of acetylcholinesterase activity after selection by avermectins in diamondback moth

世代 Generation	AChE 活性 $OD_{412}/(mg \cdot min)$	变化倍数 Relative ratio
F_0	0.164±0.003	1
F_4	0.148±0.005	0.9
F_6	0.200±0.001	1.2
F_7	0.211±0.008	1.3
F_{10}	0.189±0.005	1.2
F_{11}	0.162±0.003	1.0
F_{13}	0.172±0.008	1.0
F_{16}	0.223±0.004	1.4
F_{18}	0.119±0.007	0.7
F_{19}	0.162±0.010	1.0
F_{20}	0.179±0.008	1.1
F_{22}	0.215±0.014	1.3
F_{23}	0.156±0.002	1.0
F_{24}	0.170±0.004	1.0
F_{25}	0.141±0.010	0.9
F_{26}	0.167±0.003	1.0
F_{27}	0.228±0.003	1.4

2.3　增效剂对 AVMs 抗性品系的增效作用

对 AVMs 抗性品系以 AVMs 加增效剂（Pb）和不加 Pb 两种处理，进行生物测定，AVMs 对抗性品系的毒力 LC_{50}值为 8.940（4.741～18.218），加增效剂（Pb）后，LC_{50}值降为 1.410（0.212～6.785），增效 6.34 倍，抗性倍数从 813 倍下降到 128 倍。说明 MFO 活性提高是小菜蛾对 AVMs 抗性的机制之一。

3　讨论

用 AVMs 选育 27 代后，小菜蛾对 AVMs 的抗性是同源不接触药剂种群的 812.73 倍。开始选育至 21 代，抗性缓慢上升，达到选育前的 122.91 倍，比用菊酯类选育抗性增长缓慢，Yu 和 Nguyen 用氯菊酯选育小菜蛾至 21 代，抗性超过 600 倍[19]。而比用有机氮类杀虫剂选育抗性增长快，用杀虫双和杀螟丹在实验室以点滴法处理小菜蛾 4 龄幼虫，连续继代选育至

35代，对杀虫双和杀螟丹的抗性比选育前提高了51倍和25倍[20]。以AVMs对小菜蛾继续选育至27代，抗性迅速增长，达到选育前的812.73倍，抗性发展呈现S型曲线。

小菜蛾选育不同代数AChE、CarE、GST活性测定表明，随着选育代数的增加，AChE活性变化不大，AVMs的选育对小菜蛾AChE没有明显的影响。GST活性变化较大，选育27代是选育前的2.2倍，而且从选育18代开始，GST活性在较高水平上波动。选育的27代CarE活性是选育前的1.4～1.5倍，而且从22代开始，CarE活性在较高水平上波动，说明小菜蛾对AVMs抗性水平的提高可能与GST和CarE活性增强有关。

用增效醚（Pb）对AVMs抗性品系处理，进行生物测定，加Pb比不加Pb AVMs对小菜蛾抗性品系毒力增加6.34倍。说明MFO活性提高可能是小菜蛾对AVMs抗性的重要机制之一。Sun对台湾小菜蛾的研究表明，小菜蛾对AVMs的抗性与MFO有关[21]。Iqbal和Wright对AVMs选育的室内220倍的小菜蛾抗性种群，用Pb、DEF和马来酸二乙酯处理，结果使AVMs毒效分别增加4倍、3倍和2倍，因而推测小菜蛾对AVMs的抗性可能与MFO、酯酶和GST有关[22]。本研究结果表明，小菜蛾对AVMs的抗性机制可能涉及MFO、GST、CarE等多个酶系统，还可能与AVMs的靶标GABA受体的变构有关。从以上多种抗性机制分析，小菜蛾对AVMs的抗性遗传可能为多基因控制。小菜蛾对AVMs的主导抗性机制及抗性遗传规律还有待于进一步研究。

参 考 文 献 (References)

[1] Hama H. Development of pyrethroid resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). Appl. Entomol. Zool., 1987, 22: 166～175

[2] 周成理，唐振华，张丽姝．小菜蛾幼虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗药性与多功能氧化酶的关系．植物保护学报，1993，20（1）：91～95

[3] Argentine J A, Clark J M, Lin H. Genetics and biochemical mechanisms of abamectin resistance in two isogenic strains of colorado potato beetle. Pestic. Biochem. Physiol., 1992, 44: 191～207

[4] Argentine J A, Clark J M. Selection for abamectin resistance in colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Pestic. Sci., 1990, 28: 17～24

[5] Clark J M, Argentine J A, Lin H *et al*. Mechanisms of abamectin resistance in the colorado potato beetle. In: Mullins C A, Scott J G eds. Molecular Mechanisms of Insecticide Diversity among Insects. Washington, DC. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 322. 1992, 247～263

[6] Konno Y, Scott J G. Biochemistry and genetics of abamectin resistance in the housefly. Pestic. Biochem. Physiol., 1991, 41: 21～28

[7] Clark J M, Scott J G, Campos F *et al*. Resistance to avermectins: extent, mechanisms, and management implications. Annu. Rev. Entomol., 1994, 40: 1～30

[8] 帅应垣，冯 夏，陈焕瑜．广东供港菜区小菜蛾抗药性研究初报．广东农业科学，1994，4：31～32，18

[9] Wright D J, Iqbal M, Verkerk R H J. Resistance to *Bacillus thuringiensis* and abamectin in the diamondback moth, *Plutella xylostella*: a major problem for integrated pest management? Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent., 1995, 60 3b: 927～933

[10] 陈之浩，刘传秀，李凤良等．小菜蛾继代繁殖大量饲养方法研究初报．贵州农业科学，1990，(4)：52～53

[11] 刘传秀，韩招久，李凤良等．应用蛭石萝卜苗法室内继代大量繁殖小菜蛾的研究．昆虫知识，1993，30（6）：341～344

[12] Ismail F, Wright D J. Cross-resistance between acylurea insect growth regulators in a strain of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) from Malaysia. Pestic. Sci., 1991, 33: 359～370

[13] Ismail F, Wright D J. Synergism of teflubenzuron and chlorfluazuron in an acylurea-resistant field strain of *Plutella xylostella* (L.) (*Lepidoptera*: *Yponomeutidae*). Pestic. Sci., 1992, 34: 221～226

[14] 高希武，郑炳宗，陈仲兵．小菜蛾羧酸酯酶性质的研究．南京农业大学学报，1996，19 (Suppl.)：122～126

[15] 李腾武，高希武，郑炳宗等．不同地区小菜蛾种群羧酸酯酶的毒理学性质研究．昆虫学报，1998，41 (Suppl.)：26～33

[16] Habig W H. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. In: William B J ed. Method in Enzymology. Academic Press, 1981, 77: 398～405

[17] Gorun V, Proinov L, Baltescu V *et al*. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations. Anal. Biochem., 1978, 86: 324～326

[18] 高希武．Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍．昆虫知识，1987，24：245～246

[19] Yu S J, Nguyen S N. Insecticide susceptibility and detoxication enzyme activities in permethrin-selected diamondback moths. Pestic. Biochem. Physiol., 1996, 56: 69～77

[20] 陈之浩，刘传秀，李凤良等．杀虫双和杀螟丹选育对小菜蛾抗药性的形成及其抗性机制．昆虫学报，1993，36：409～418

[21] Sun C N. Insecticide resistance in diamondback moth. In: Talker N S ed. Diamondback Moth and other Crucifer Pests Proceedings of the Second International Workshop, Tainan, Taiwan, Taipei. 1992, 419～426

[22] Iqbal M, Wright D J. Evaluation of resistance, cross-resistance and synergism of abamectin and teflubenzuron in a multi-resistance field population of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Bull. Entomol. Res., 1997, 87: 481～486

Study on resistance selection by avermectins and its effect on activities of detoxification enzymes in *Plutella xylostella* (L.)

LI Teng-wu, GAO Xi-wu*, ZHENG Bing-zong, XU Xiang-li

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: The resistance selection of diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (L.), to avermectins (AVMs) and its effect on activities of detoxification enzymes in AVMs-selected DBM were investigated during 1996～1999. After 27 generations of continuous selection pressure, resistance to AVMs was over 812-folds in this strain compared with the unselected parents. Resistance selection by AVMs has no effect on activity of acetylcholinesterase (AChE). The activities of carboxylesterase (CarE) and glutathione S-transferases (GST) in DBM larvae of F_{27} generation increased 1.5 and 2.2-folds respectively, compared with the unselected parents (F_0). Piperonyl butoxide (Pb) can moderately increase the toxicity of AVMs to the selected strain for about 6-folds. It suggests that the resistant mechanisms of DBM to AVMs were probably associated with microsomal mixed function oxidases (MFO), GST and CarE.

Key words: *Plutella xylostella*; avermectins; resistance selection; detoxification; acetylcholinesterase

* Author for correspondence